



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 2 月 2 4 日
Date of Application:

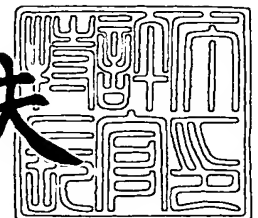
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 4 5 2 2 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 4 5 2 2 4]

出 願 人 独立行政法人産業技術総合研究所
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 113MS0465

【提出日】 平成15年 2月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府池田市緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立行政法人産業
技術総合研究所関西センター内

 【氏名】 石川 一彦

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府池田市緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立行政法人産業
技術総合研究所関西センター内

 【氏名】 全 崇鍾

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 理事長 吉川 弘之

 【連絡先】 0 7 2 7 - 5 1 - 9 6 8 1

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 耐熱性DNAリガーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 100℃で1時間の熱処理により実質的に活性が低下しない耐熱性DNAリガーゼ。

【請求項 2】 以下の(a)、(b)及び(c)の性質を備える請求項 1 に記載の耐熱性DNAリガーゼ。

- (a) 至適温度が70℃以上である。
- (b) コファクターとしてATP又はADPを利用することができる。
- (c) コファクターとして Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 又は Co^{2+} を利用できる。

【請求項 3】 *Aeropyrum pernix*由来の酵素である請求項 1 又は 2 に記載の耐熱性DNAリガーゼ。

【請求項 4】 以下の(1)又は(2)のポリペプチド。

- (1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2) 配列番号 2 において、1 又は 2 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的にDNAリガーゼ活性が低下しないポリペプチド。

【請求項 5】 以下の(3)、(4)又は(5)のポリヌクレオチド。

- (3) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- (4) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的に活性が低下しない耐熱性DNAリガーゼをコードするポリヌクレオチド。
- (5) 請求項 4 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の形質転換体を培養し、その形質転換体から耐熱性DNAリガーゼを回収する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAの組み換えやDNA増幅等の遺伝子工学の分野で使用される耐熱性DNAリガーゼなどに関する。

【0 0 0 2】**【従来の技術】**

DNA リガーゼはDNAの3'-OH基と5'-リン酸基との間にホスホジエステル結合を形成することにより、DNA鎖同士を連結する活性を有する酵素である。この酵素は遺伝子組換え技術において不可欠な酵素である。遺伝子組み替えには、通常、細菌やファージ由来の易熱性のDNAリガーゼが使用されている。

【0 0 0 3】

また、DNAリガーゼはリガーゼ連結反応（LCR）という特異的ヌクレオチド増幅反応にも使用されている（Landegren U., (1988)Science, 241:1077-1080; Barany, F. (1991)PCR Methods and applications 1:5-16; Marsh E., (1992)Strategies 5:73-76）。LCRは、耐熱性のDNAリガーゼを用いて温度サイクリング反応を行うことにより既知のヌクレオチド配列を増幅及び検出する方法である。詳述すれば、LCRは、目的とするヌクレオチド配列に相補的な二つの隣接するオリゴヌクレオチド、その各々に相補的なオリゴヌクレオチド及び耐熱性DNAリガーゼを混合し、高温における変性及び低温におけるアニーリング及び連結反応からなる温度サイクルを繰り返すことにより実施される。LCRでは、耐熱性DNAリガーゼとして *Pyrococcus furiosus* の Pfu DNAリガーゼ等が用いられてる。

【0 0 0 4】

耐熱性DNAリガーゼとしては、その他、超好熱性始原菌のKOD-1株から単離されたDNAリガーゼであって、至適温度が80℃であり、100℃の温度下でも活性を示す耐熱性DNAリガーゼが知られている（特許文献1参照）。

【0 0 0 5】

しかし、試料の加熱及び冷却を繰り返すLCRに用いるDNAリガーゼは、高温下で活性を有するのみならず、高温で長時間熱処理した後にも当初と同様の活性を保持することが望ましい。

【0 0 0 6】

【特許文献 1】

特開平12-308494号（段落0007、0056など）

【0 0 0 7】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、高温で熱処理した後にも高い活性を保持するDNAリガーゼを提供することを主目的とする。

【0 0 0 8】**【課題を解決するための手段】**

前記目的を達成するために本発明者は研究を重ね、超好熱性始原菌Aeropyrum pernix K1株からDNAリガーゼ遺伝子をクローニングし、そのDNAリガーゼが100℃で1時間の熱処理によっても実質的に活性が低下しない、極めて優れた耐熱性を有するDNAリガーゼであることを見出した。

【0 0 0 9】

本発明は前記知見に基づき完成されたものであり、以下の耐熱性DNAリガーゼ等を提供する。

【0 0 1 0】

項 1. 100℃で1時間の熱処理により実質的に活性が低下しない耐熱性DNAリガーゼ。

【0 0 1 1】

項 2. 以下の(a)、(b)及び(c)の性質を備える項 1 に記載の耐熱性DNAリガーゼ。

(a) 至適温度が70℃以上である。

(b) コファクターとしてATP又はADPを利用することができる。

(c) コファクターとしてMg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺又はCo²⁺を利用できる。

【0 0 1 2】

項 3. Aeropyrum pernix由来の酵素である項 1 又は 2 に記載の耐熱性DNAリガーゼ。

【0 0 1 3】

項 4. 以下の(1)又は(2)のポリペプチド。

- (1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2) 配列番号 2 において、1 又は 2 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的にDNAリガーゼ活性が低下しないポリペプチド。

【0014】

項 5. 以下の(3)、(4)又は(5)のポリヌクレオチド。

- (3) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- (4) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的に活性が低下しない耐熱性DNAリガーゼをコードするポリヌクレオチド。
- (5) 項 4 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0015】

項 6. 項 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0016】

項 7. 項 6 に記載のベクターを保持する形質転換体。

【0017】

項 8. 項 7 に記載の形質転換体を培養し、その形質転換体から耐熱性DNAリガーゼを回収する方法。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) DNAリガーゼ

耐熱性

本発明のDNAリガーゼは非常に耐熱性に優れる酵素であり、100℃で1時間の熱処理によっても実質的にDNAリガーゼ活性が低下しない酵素である。本発明において、「実質的に活性が低下しないこと」には、例えば、熱処理前の活性の90%以上の活性が残存する場合が含まれる。

【0019】

本発明のDNAリガーゼは、100℃で2時間熱処理した後にも実質的に活性が低下

しない酵素であることが好ましく、100℃で12時間熱処理した後にも実質的に活性が低下しない酵素であることがより好ましい。また、110℃で10分間の熱処理の後にも80%以上の活性が残存する酵素であることがさらにより好ましい。

【0020】

また、酵素反応を行う緩衝液の種類によっても異なるが、本発明のDNAリガーゼは、酵素反応の初速度を測定した場合の至適温度が70℃以上の酵素であることが好ましい。

【0021】

本発明において、DNAリガーゼ活性は、実施例の項目に記載のニックトランスレーションアッセイ又はコヘジティブエンドライゲーションアッセイにより測定した値である。

常温での安定性

本発明のDNAリガーゼは、常温下での安定性にも勿論優れる。本発明のDNAリガーゼは、常温（25℃）で10日間以上放置しても実質的に活性が低下しないことが好ましい。

有機溶媒耐性

本発明のDNAリガーゼは、有機溶媒に耐性である。例えば、エタノール、ブタノール、テトラヒドロフラン、酢酸エチル等の有機溶媒を20容量%以上含む緩衝液中で活性を示す酵素であることが好ましい。本発明のDNAリガーゼが酵素活性を示し得る、緩衝液中の有機溶媒の容量比率の上限は、酵素蛋白が沈殿しない範囲である。

コファクター

本発明の耐熱性DNAリガーゼは、通常コファクターとしてATPまたはNADを要求する。本発明のDNAリガーゼは、コファクターとしてATP及びADPのいずれも用いることができるものであることが好ましい。

【0022】

また本発明のDNAリガーゼは、2価カチオンを要求するが、2価カチオンとしてMg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺又はCo²⁺のいずれも利用できることが好ましい。

生産細菌

本発明の耐熱性DNAリガーゼの由来は特に限定されないが、好熱性細菌、例えばAeropyrum属、Pyrococcus属、Thermococcus属、Sulfolobus属、Thermoplasma属、Thermoproteus属、Mastigocladus属、Bacillus属、Synechococcus属又はThermus属等の細菌により生産されたものが挙げられる。特に、超好熱性古細菌Aeropyrum pernixにより生産されたものが好ましい。

アミノ酸配列

また、本発明の耐熱性DNAリガーゼとしては、以下のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

- (1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2) 配列番号 2 において、1 又は 2 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的にDNAリガーゼ活性が低下しないポリペプチド。

【 0 0 2 3 】

(2) のポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~200個程度、特に 1~100個程度のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであることが好ましいが、DNAリガーゼ間で保存されていない領域であれば、配列番号 2 のアミノ酸配列を、全アミノ酸数の30%以下の範囲で改変したものであってよい。

【 0 0 2 4 】

具体的には、例えばアミノ酸の置換の場合には、タンパク質の構造保持の観点から、極性、電荷、可溶性、親水性／疎水性等の点で、置換前のアミノ酸と類似した性質を有するアミノ酸に置換することができる。例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリンは非極性アミノ酸に分類され；セリン、トレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンは極性アミノ酸に分類され；フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンは芳香族側鎖を有するアミノ酸に分類され；リジン、アルギニン、ヒスチジンは塩基性アミノ酸に分類され；アスパラギン酸、グルタミン酸は酸性アミノ酸に分類される。従って、同じ群のアミノ酸から選択して置換することができる。

【 0 0 2 5 】

また、アミノ酸の置換により側鎖が小さくなる場合は、ポリペプチドの 3 次元構造が変化し難く、それにより活性が変化し難いため、配列番号 2 のアミノ酸配列についてこのような置換を行うことにより (2) のポリペプチドを得ることができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の DNA リガーゼは、例えば、この酵素を生産する細菌を培養し、菌体破砕液から回収又はさらに精製することにより得られる。また、配列番号 2 のアミノ酸配列を基に化学的に合成することによっても得ることができる。また、後述する本発明方法によっても得られる。

(2) ポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、以下の (3)、(4) 又は (5) のポリヌクレオチドである。

(3) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(4) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、100℃で1時間の熱処理により実質的に活性が低下しない耐熱性 DNA リガーゼをコードするポリヌクレオチド。

(5) 上記の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【 0 0 2 7 】

本発明のポリヌクレオチドには、特に言及しない限り、その塩基配列を有するポリヌクレオチドの他、それに相補的なポリヌクレオチドが含まれる。また、本発明のポリヌクレオチドには DNA 及び RNA の双方が含まれる。また、本発明の目的を達成できる範囲であれば修飾された DNA (例えばホスホロチオエート DNA、H-ホスホネート DNA など) 及び修飾された RNA も含まれる。さらに、1 本鎖ポリヌクレオチド、2 本鎖ポリヌクレオチドの双方が含まれ、2 本鎖ポリヌクレオチドには、DNA・RNA ハイブリッドも含まれる。

【 0 0 2 8 】

本発明において、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、通常のハイブリダイゼーション溶液中であれば 6 8℃で行う条件が挙げられ、5 0 % フォルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中であれば 4 2℃で行う条件が挙げられ

る。詳しくは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版第 2 巻に記載のサザンハイブリダイゼーションに用いられる条件が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

(4) の DNA は、配列番号 2 の アミノ酸配列において 1 ～ 200 個程度、特に 1 ～ 100 個程度の アミノ酸が欠失、置換若しくは付加された アミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが好ましい。しかし、DNA リガーゼ間で保存されていない領域であれば、配列番号 2 の アミノ酸配列を全アミノ酸数の 30% 以下の範囲で改変したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであってよい。

【 0 0 3 0 】

本発明のポリヌクレオチドは、例えばアエロパイラム (Aeropyrum) 属、パイロコッカス (Pyrococcus) 属、スフォロバス (Sulfolobus) 属、サーモプラズマ (Thermoplasma) 属、サーモプロテウス (Thermoproteus) 属、マスティゴクラダス (Mastigocladus) 属、バチルス (Bacillus) 属、シネココッカス (Synechococcus) 属、サーマス (Thermus) 属等の好熱性細菌の染色体 DNA のライブラリーから、配列番号 1 に基づき設計したプローブを用いてハイブリダイゼーションにより単離することができる。また、配列番号 1 の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて、例えば上記好熱性細菌の染色体 DNA ライブラリーを鋳型にして PCR 法により増幅することもできる。また、化学合成によっても取得できる。

【 0 0 3 1 】

また、(4) の変異したポリヌクレオチドは、化学合成法、遺伝子工学的手法、突然変異誘発法などの公知の方法で作成することができる。遺伝子工学的手法としては、(3) の DNA リガーゼ遺伝子に対して、エキソヌクレアーゼを用いたヌクレオチド欠失導入、リンカー導入、位置指定突然変異導入、変異プライマーを用いた PCR 法による塩基配列の改変などを行う方法が挙げられる。

(3) ベクター

本発明のベクターは、上記説明した本発明のポリヌクレオチド（ここでは DNA）を含有する組換えベクターである。本発明の DNA が組み込まれるベクターは公知のものを広く利用でき、細菌用ベクターの他、酵母用ベクター、動物細胞用ベ

クター等も利用できる。酵素の生産効率の点から、通常は細菌用ベクターを用いればよい。公知のベクターとしては、大腸菌ベクターのpBR322、pUC19、pKK233-2等、バチルス属細菌ベクターのpUB110、pC194、pE194、pTHT15、pBD16等、酵母用ベクターYip5、Yrp17、Yep24等、動物細胞用ベクターpUC18、pUC19、M13mp18等を例示できる。

(4) 形質転換体

また、本発明の形質転換体は、上記説明した本発明の組換えベクターを保持する形質転換体である。宿主としては、ベクターに応じて細菌、酵母、動物細胞等を利用できる。宿主としては、バチルスズブティリス (*Bacillus subtilis*)、バチルスブレビス (*Bacillus brevis*)、酵母、カビ等が、大量に目的タンパク質を生産できる点で好ましい。形質転換は、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等の公知の方法で行うことができる。これらの公知の方法の中から、宿主の種類に応じて選択すればよい。

(5) DNAリガーゼの製造方法

本発明のDNAリガーゼの製造方法は、本発明の形質転換体を培養し、この形質転換体からDNAリガーゼを回収する方法である。

【 0 0 3 2 】

培養条件は、特に限定されず、宿主の生育が可能な培地、温度等の条件下で培養すればよい。培養時間は、その他の培養条件により異なるが、通常12～24時間程度とすればよい。温度シフト型やIPTG (Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) 誘導型等の誘導型の発現ベクターを用いる場合は、誘導時間は2～8時間程度とすればよい。

【 0 0 3 3 】

目的とするDNAリガーゼが宿主細胞内又はペリプラズム内に生産される場合は、超音波処理や界面活性剤処理などの公知の細胞破壊方法により細胞を破壊してDNAリガーゼを回収すればよい。宿主がDNAリガーゼを分泌する場合は、培地中に分泌されたDNAリガーゼを回収すればよい。

【 0 0 3 4 】

回収されたDNAリガーゼをさらに精製する場合は、遠心分離、塩析、溶媒沈殿法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティクロマトグラフィー法、逆相高速液体クロマトグラフィー法等の公知の蛋白精製方法を組み合わせて精製することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明の耐熱性DNAリガーゼを精製する場合、精製ステップの一つとして、熱処理を行うことが好ましい。熱処理は、宿主の生育限界温度より通常10℃以上、特に15℃以上高い温度で、かつ、当該熱処理により本発明のDNAリガーゼの活性が60～80%程度残存する温度である80～95℃程度の温度で、10～60分間程度行うことが効率的である。これにより、目的とするDNAリガーゼを殆ど失活させることなく、宿主が生産する夾雑タンパク質を変性により失活させることができる。この加熱処理後に、被精製酵素溶液を、特に限定されないが、例えば15000rpm程度で20分間程度遠心することにより変性した夾雑タンパク質を沈殿させることができる。この加熱処理工程は、精製のいずれの段階で行ってもよい。これにより耐熱性DNAリガーゼの精製度を飛躍的に向上させることができる。

【 0 0 3 6 】

【実施例】

以下、本発明を実施例を示してより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例 1 (Aeropyrum pernix K1株のDNAリガーゼ遺伝子のクローニング)

i) 染色体DNAの調製

バクトマリン培地 (Difco) 37.4g とNa₂S₂O₃-5H₂O 1.0g を水1リットルに溶かした後、pHを7.0～7.2に調整することにより培地を調製し、加圧加熱滅菌した。超好熱性古細菌Aeropyrum pernix K1株（理化学研究所においてJCM9820として登録）をこの培地に接種し、90℃で3日間振盪培養した。培養液を5,000rpmで10分間遠心分離することにより集菌した。

【 0 0 3 7 】

菌体を10mM トリス(pH 7.5)-1mM EDTA 溶液で2回洗浄後インサートアガロース (InCert Agarose、FMC社製) ブロック中に封入した。このブロックを1 %N-

ラウロイルサルコシン—1mg/ml プロテアーゼK溶液中で処理することにより、染色体DNAがアガロースブロック中に分離調製された。インサートアガロースブロックを用いた染色体DNAの分離条件は、アガロースブロックの添付マニュアルに従った。

ii)DNAリガーゼ遺伝子の増幅

配列番号 1 の塩基配列を含むDNAをPCR法により増幅した。PCR条件は、PCRキットの添付マニュアルに従った。5'末端側に対応するプライマーとしては、配列表の配列番号 1 に示すDNA配列において、塩基番号 1 から始まる（すなわち開始コドンから始まる）オリゴヌクレオチドプライマーを合成した（5'-GGCTGTCTGTTT TGGCTTCT-3'；配列番号 3）。また、3'末端側に対応するプライマーとしては、*Aeropyrum pernix* K1株の染色体DNAにおいて配列番号 1 の塩基配列の 3'末端より下流域に対応するプライマーであって、増幅されたDNA中に制限酵素のBamHIサイトが生じるようなプライマーを合成した（5'-GTGAAGGGATCCTTACACCTGCTCCGC-3'；配列番号 4）。PCR反応後、DNAを制限酵素のBamHIで37℃で3時間処理することにより完全分解した。次いで、DNAリガーゼ遺伝子を精製カラムキットを用いて精製した。

iii)DNAリガーゼ遺伝子を含むベクターの構築

ベクターのpET-3d（Novagen社製）を制限酵素NcoIで切断し、精製した後、T4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化した。精製したプラスミドを制限酵素BamHIで切断し、精製した。次いで、BamHIで切断されたプラスミドpET-8cと BamHIで切断された上記のDNAリガーゼ遺伝子とをT4リガーゼを用いて16℃で、16時間反応させることにより連結した。連結したDNAを用いて、大腸菌(*E. coli*) JM 109 株（TAKARA 社製）のコンピテントセルを形質転換した。形質転換体は、0.05 mg/mlのアンピシリンを含むLB寒天プレート上でのコロニー形成を指標に選択した。形質転換体からDNAリガーゼ遺伝子含有プラスミドをアルカリ法で抽出した。

実施例 2（組み換えDNAリガーゼの発現）

i)DNAリガーゼ遺伝子を含む形質転換体の作製

1.5ml容チューブ内に、大腸菌 (*E. coli*) Rosetta (DE3)株（Novagen社製）

のコンピテントセル0.1ml (2000000cfu) と、上記調製したDNAリガーゼ遺伝子含有プラスミドDNA溶液0.002ml (プラスミドDNA10ng) を加え氷中に30分間放置した後、42℃で30秒間ヒートショックを与えた。次いで、チューブ内にSOC medium を1ml加え、37℃で1時間振とう培養した。次いで、アンピシリンを含むLB寒天プレートに塗布し、37℃で一晩培養することにより形質転換体を得た。

ii) DNAリガーゼの精製

得られた形質転換体をアンピシリンを含むNZCYM培地に接種し、600nmにおける吸光度が0.5に達するまで、37℃で培養した後、プラスミドの発現量を高めるためにIPTGを加えさらに4時間培養した。培養液を8,000rpmで10min遠心分離することにより集菌した。

【0038】

集菌した菌体2.8gに、1mM DTT、1mM EDTA、10mM MgCl₂を含む50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 50mlを加え、菌体を90Wの出力で3分間超音波破碎した。破碎した菌液を15,000rpmで30分間遠心分離し、上清を採取した。

【0039】

夾雑蛋白を沈殿させて除去する目的で、この上清を85℃で30分間加熱した後、15,000rpmで20分間遠心分離し、上清を採取した。上清を、15 mM MgCl₂、0.1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.2) 中で透析し、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換樹脂のHitrapQ (ファルマシア社製) カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。

【0040】

さらに、活性画分を、150 mM NaCl、15 mM MgCl₂ を含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.2) 中で透析し、同緩衝液で平衡化したゲル濾過材のSephacryl S-100 HR26/60 (ファルマシア社製) カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。活性画分には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一バンドを与える均一標品が含まれていた。

【0041】

また、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、本酵素の分子量は約69kDaであった。

実施例 3 (超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 株の DNA リガーゼ遺伝子の同定)

実施例 1 で得られた超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 株の染色体 DNA 中の DNA リガーゼ遺伝子の DNA 配列を配列番号 1 に示す。また、実施例 2 で得られた *Aeropyrum pernix* K1 株の DNA リガーゼのアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

実施例 4 (耐熱性 DNA リガーゼの性質)

前記の方法で得られた *Aeropyrum pernix* K1 株由来の DNA リガーゼの諸特性を評価した。DNA リガーゼ活性は以下に示すニッククロージングアッセイ又はコヘジティブエンドライゲーションアッセイにより測定した。

<ニッククロージングアッセイ>

ニッククロージングアッセイ (nick-closing assay ; J. Bacteriology, vol. 182, p6424-6433, 2000 年) により DNA リガーゼ活性を測定する。詳述すれば、以下の 3 種類の DNA プライマー

AL1: 5'-phosphorylated 5'-TAAGCTCCGGATTGTCCGGGAGGTAAAGCCCTGAT-3' (配列番号 5)

AL 2: 5'-CACAGGAAGCTCTACAGGTACTCCG-3' (配列番号 6)

AL3: 5'-TGATCATCAGGGCTTTACCTCCCGACAATCCGGAGCTTACGGAGTACCTGTAGAGCTTCCTGTGCAAGC-3' (配列番号 7)

を各 0.001mg と、最終的に (final) 20nM の DNA リガーゼと、20 μ l の反応液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50mM KCl、10 mM MgCl₂、5mM DTT、0.1 mM ATP) とを混合し、70 (C で 10 分間反応させた後、反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド (1mg/ml) 溶液で染色する。次いで、デンストメーターを用いて、上記 3 つのオリゴヌクレオチドが連結して生じるオリゴヌクレオチドに相当するバンドの濃度を測定することにより、反応産物量を相対的に評価する。反応産物量の相対値は、DNA リガーゼ活性の相対値を示す。

<コヘジティブエンドライゲーションアッセイ>

コヘジティブエンドライゲーションアッセイ (cohesive end ligation assay ; Extremophiles, vol. 5, p161-168, 2001 年) により DNA リガーゼ活性を測定する。詳述すれば、0.5 μ g の Hind-III で切断した λ DNA と、最終的に (final) 100

nMのDNAリガーゼと、20 μ lの反応液（50 mM Tris-HCl（pH 7.5）、50 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、1 mM ATP）とを混合し、37℃で2時間反応させる。次いで、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド（1mg/ml）溶液で染色する。次いで、連結されて生じる λ DNAに相当するバンドの濃度をデンスitomーターで測定することにより反応産物量の相対値を評価する。反応産物量の相対値は、DNAリガーゼ活性の相対値を示す。

i) 至適温度

ニッククロージングアッセイ及びコヘジティブエンドライゲーションアッセイにより、30～90℃の温度下で、DNAリガーゼ活性を測定した。酵素活性の相対値を図1に示す。図1から分かるように、pH 7.5のTris-HClバッファー中での本酵素の至適温度は70℃である。

ii) 耐熱性

反応液（50 mM Tris-HCl（pH 7.5）、10 mM MgCl₂、5mM DTT）中にDNAリガーゼを濃度0.1mg/ml、1mg/ml及び10 mg/mlになるように添加した各3つの酵素溶液サンプル（計9サンプル）を用意した。各酵素濃度の3つのサンプルを、それぞれ100℃、105℃、及び110℃で1時間インキュベートして経時的に残存活性を測定した。100℃及び110℃の場合は、加圧することにより当該温度に設定した。

【0 0 4 2】

各インキュベーション温度での残存活性は、DNAリガーゼ濃度にかかわらず、略同じであった。各インキュベーション温度につき、DNAリガーゼ濃度が異なる3サンプルの残存活性を平均した。結果を図2に示す。

【0 0 4 3】

本酵素は、100℃でインキュベートした場合に1時間後に97%程度の活性が残った。なお、ここには示さないが、100℃で12時間インキュベートした後にも90%程度の活性が残った。また、105℃でインキュベートした場合に10分間後に100%程度の活性が残り、20分後に85%程度の活性が残った。110℃でインキュベートした場合は、10分後に80%程度の活性が残り、20分後に65%程度の活性が残った。

iii) コファクター

ATP/ADP

上記説明したコヘジティブエンドライゲーションアッセイ及びニッククロージングアッセイにおいて、ATPに代えてそれぞれADPを用いて、同様にDNAリガーゼ活性を測定した。その結果、ATPの場合と略同様のDNAリガーゼ活性が測定された。本酵素は、ATPに代えてADPを利用して同様に酵素反応を行えることが分かる。

カチオン

また上記説明したコヘジティブエンドライゲーションアッセイ及びニッククロージングアッセイにおいて、10 mM $MgCl_2$ に代えて、10mM $MnCl_2$ 、10mM $CaCl_2$ 及び10mM $CoCl_2$ をそれぞれ用いてDNAリガーゼ活性を測定した。また、これらのカチオンを添加せずにDNAリガーゼ活性を同様に測定した。この結果、2価カチオンを添加しない場合は、本酵素の活性は極めて低かったが、 $MnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 及び $CoCl_2$ のいずれを添加した場合も、 $MgCl_2$ を添加した場合と同様のDNAリガーゼ活性が測定された。

【 0 0 4 4 】

このことから、本酵素は、コファクターとして2価カチオンを要求し、2価カチオンとして Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 又は Co^{2+} のいずれも利用できることが分かる。

【 0 0 4 5 】

【発明の効果】

本発明によれば、高温での熱処理の後にも高い活性を保持できる耐熱性DNAリガーゼが提供された。

【 0 0 4 6 】

さらにいえば、超好熱性始原菌*Aeropyrum pernix* K1株から単離されたDNAリガーゼは、100℃で1時間熱処理しても実質的に活性が低下せず、110℃で10分間の熱処理によっても80%以上の活性が残存する極めて耐熱性の高い酵素である。LCRにおいては、通常90～100℃程度の加熱／50～65℃程度の冷却の熱サイクルを繰り返すことから、このような熱処理によっても高い活性を保持するDNAリガーゼが必要であるところ、本酵素は、DNAリガーゼ活性が100℃で1時間の熱処理によっても維持されるため、LCRに供するDNAリガーゼとして好適に使用できる。

【 0 0 4 7 】

また一般に、DNAライゲーションは、酵素の失活等を回避するために、反応液を氷冷しながら迅速に操作する必要がある。本酵素は、常温下での安定性にも優れるため反応液をそれほど厳密に冷却しなくてもよく、またそれほど迅速に操作しなくてもよくなるというメリットがある。また、DNAライゲーションを比較的高い温度下で行えるため、夾雑タンパク質の影響を低減することができ、酵素反応効率がよくなる。

【0048】

また本酵素は常温下でも安定であるため、長期保存が可能である。

【0049】

また、本酵素は分子構造が安定であることから有機溶媒にも耐性であり、一般に酵素が失活しやすい有機溶媒中あるいは有機溶媒水溶液中においてDNAリガーゼ反応を行える。このことから、新たなDNA関連反応の開発を期待できる。

【0050】

本酵素は、コファクターとしてATPを利用でき、またATPに代えてADPを利用することもできる。ADPはATPより安定な化合物であり、ATPより安価である。また本酵素は、2価カチオンを要求するが、2価カチオンとして Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 及び Co^{2+} のいずれも利用できる。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Heat-resistant DNA ligase

<130> 90302JP

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1860

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<400> 1

```

gtggggtgtc tggttttggc ttctagctct ggggggtgtt gaggcggtga catgcctttc      60
aagcccgtgg ctgaggcctt cgcctccatg gagaggataa cctctaggac gcagctcacc      120
ctcctcctca caaggctctt caagtccacg cccccggggg cgatcggtat tgtggtgtac      180
ctgatccagg ggaagctggg gcccgactgg aaggggctgc cggagctggg tgtcggggag      240
aagctgcttg taaaggccat agccctggct tacaaggcca ctgaggagag ggttgagagg      300
ctctacaagt ctgtaggcga cctggggagt gtggccgaga ggctgtcgcg ggagtaccgc      360
tcccgggctg ccagggccgt caccctggag gcgttcattg cgggaggggg ggaggcgctg      420
actgtgagga gggtttataa cacgctgtac aggatagcca tggcgcaggg tgaggggagc      480
agggacatca agcttaggct gctggccggc ctcctggcgg acgccgagcc cgtggaggcg      540
aagtatatgt tgaggtttgt ggaggggagg ctgagggtgg gtgttgggga cgcgaccgtc      600
ctcgacgcc tcgcatggc cttcggcggc gggggccacg cgaggcccgt tatagagagg      660
gcctacaacc tcagggccga cctaggctac atagcggagg tcgtggccag ggagggtgtt      720
gatgcgctga ggggtgtgaa gcccaggtc ggcgttccta taaggccgat gctggccgag      780
agggggaggg acccggtga gatactcagg aaggtggggg gcagggtgt cgtcgagtat      840
aagtacgatg gggagagggc gcagatacac aagaaggacg gggaggtcta catctactcg      900
aggaggcttg agaacataac caggatgttc cccgacgtgg ttgagatggc gaggaagggc      960
ctcaaagccg gggaggctat agtcgagggg gagatagtgg ccgtagacc agacaactat     1020
gagatacagc cttccaggt cctcatgcag aggaagagga agcacgacat acacagggtc     1080
atgagggagg tgcccgtcgc cgtcttctc ttcgacgcc tctacgtgga cggcgaggac     1140
ctcacaagca aaccctccc cgagaggcgc aggaggctca aggagatagt tgtggagacg     1200
cccctctgga ggctggcgga gtccatcgag accagcgacc ccgaggagct gtggaccttc     1260
ttcctgaagg ccatagagga gggggccgag ggcgtcatgg tcaaggccgt ccacagggac     1320
tcagtctaca ccgcgggcgt aagggggtgg ctgtgggtca agctgaagag ggattacaag     1380
agcgagatga tggacacggt ggacctcgta gtggtgggcg cttctacgg cagggggaag     1440
aggggcggga agctcagcag cctgctcatg gccgcctacg accagacag ggacgtgttc     1500

```

cccaccgtct gcaaggtggc cacagggttc acggacgagg agctggacag gatgaacgag 1560
 atgctgaaga agcacatcat acccaggaag caccgaggg tagagtcgag gatagagcct 1620
 gacgtgtggg tggagcccg cctcgtggcg gagatactgg gcgccgagct caccctctca 1680
 ccaatgcaca cctgctgcct caacactgtg aggccggggg tggggataag cataaggttc 1740
 cccaggttca taaggtggag ggacgacaag agtccggagg acgcgacaac aaccacgag 1800
 ctgctcgaga tgtacaagag gcagttgagg agggttgaag agccggcgga gcaggtgtag 1860

<210> 2

<211> 619

<212> PRT

<213> Aeropyrum pernix K1

<400> 2

Val Gly Cys Leu Val Leu Ala Ser Ser Ser Gly Gly Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Asp Met Pro Phe Lys Pro Val Ala Glu Ala Phe Ala Ser Met Glu Arg
 20 25 30
 Ile Thr Ser Arg Thr Gln Leu Thr Leu Leu Thr Arg Leu Phe Lys
 35 40 45
 Ser Thr Pro Pro Gly Ala Ile Gly Ile Val Val Tyr Leu Ile Gln Gly
 50 55 60
 Lys Leu Gly Pro Asp Trp Lys Gly Leu Pro Glu Leu Gly Val Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu Val Lys Ala Ile Ala Leu Ala Tyr Lys Ala Thr Glu Glu
 85 90 95
 Arg Val Glu Arg Leu Tyr Lys Ser Val Gly Asp Leu Gly Ser Val Ala
 100 105 110
 Glu Arg Leu Ser Arg Glu Tyr Arg Ser Arg Ala Ala Arg Ala Val Thr
 115 120 125

Leu Glu Ala Phe Met Ala Gly Gly Gly Glu Ala Leu Thr Val Arg Arg
 130 135 140
 Val Tyr Asn Thr Leu Tyr Arg Ile Ala Met Ala Gln Gly Glu Gly Ser
 145 150 155 160
 Arg Asp Ile Lys Leu Arg Leu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Asp Ala Glu
 165 170 175
 Pro Val Glu Ala Lys Tyr Ile Val Arg Phe Val Glu Gly Arg Leu Arg
 180 185 190
 Val Gly Val Gly Asp Ala Thr Val Leu Asp Ala Leu Ala Met Ala Phe
 195 200 205
 Gly Gly Gly Ala His Ala Arg Pro Val Ile Glu Arg Ala Tyr Asn Leu
 210 215 220
 Arg Ala Asp Leu Gly Tyr Ile Ala Glu Val Val Ala Arg Glu Gly Val
 225 230 235 240
 Asp Ala Leu Arg Gly Val Lys Pro Gln Val Gly Val Pro Ile Arg Pro
 245 250 255
 Met Leu Ala Glu Arg Gly Arg Asp Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Val
 260 265 270
 Gly Gly Arg Ala Val Val Glu Tyr Lys Tyr Asp Gly Glu Arg Ala Gln
 275 280 285
 Ile His Lys Lys Asp Gly Glu Val Tyr Ile Tyr Ser Arg Arg Leu Glu
 290 295 300
 Asn Ile Thr Arg Met Phe Pro Asp Val Val Glu Met Ala Arg Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Lys Ala Gly Glu Ala Ile Val Glu Gly Glu Ile Val Ala Val Asp
 325 330 335
 Pro Asp Asn Tyr Glu Ile Gln Pro Phe Gln Val Leu Met Gln Arg Lys
 340 345 350
 Arg Lys His Asp Ile His Arg Val Met Arg Glu Val Pro Val Ala Val

355	360	365
Phe Leu Phe Asp Ala Leu Tyr Val Asp Gly Glu Asp Leu Thr Ser Lys		
370	375	380
Pro Leu Pro Glu Arg Arg Arg Arg Leu Lys Glu Ile Val Val Glu Thr		
385	390	395
Pro Leu Trp Arg Leu Ala Glu Ser Ile Glu Thr Ser Asp Pro Glu Glu		
405	410	415
Leu Trp Thr Phe Phe Leu Lys Ala Ile Glu Glu Gly Ala Glu Gly Val		
420	425	430
Met Val Lys Ala Val His Arg Asp Ser Val Tyr Thr Ala Gly Val Arg		
435	440	445
Gly Trp Leu Trp Val Lys Leu Lys Arg Asp Tyr Lys Ser Glu Met Met		
450	455	460
Asp Thr Val Asp Leu Val Val Val Gly Ala Phe Tyr Gly Arg Gly Lys		
465	470	475
Arg Gly Gly Lys Leu Ser Ser Leu Leu Met Ala Ala Tyr Asp Pro Asp		
485	490	495
Arg Asp Val Phe Pro Thr Val Cys Lys Val Ala Thr Gly Phe Thr Asp		
500	505	510
Glu Glu Leu Asp Arg Met Asn Glu Met Leu Lys Lys His Ile Ile Pro		
515	520	525
Arg Lys His Pro Arg Val Glu Ser Arg Ile Glu Pro Asp Val Trp Val		
530	535	540
Glu Pro Ala Leu Val Ala Glu Ile Leu Gly Ala Glu Leu Thr Leu Ser		
545	550	555
Pro Met His Thr Cys Cys Leu Asn Thr Val Arg Pro Gly Val Gly Ile		
565	570	575
Ser Ile Arg Phe Pro Arg Phe Ile Arg Trp Arg Asp Asp Lys Ser Pro		
580	585	590

Glu Asp Ala Thr Thr Thr His Glu Leu Leu Glu Met Tyr Lys Arg Gln

595

600

605

Leu Arg Arg Val Glu Glu Pro Ala Glu Gln Val

610615

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<223> Oligonucleotide as primer

<400> 3

ggctgtcttg ttttgcttc t

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<223> Oligonucleotide as primer

<400> 4

gtgaagggat ccttacacct gctccgc

27

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<223> Oligonucleotide as substrate for DNA ligase

<400> 5

taagctccgg attgtccggg aggtaaagcc ctgat

35

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<223> Oligonucleotide as substrate for DNA ligase

<400> 6

cacaggaagc tctacaggta ctccg

25

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> Aeropyrum pernix K1

<223> Oligonucleotide as substrate for DNA ligase

<400> 7

tggatcatcag ggctttacct cccggacaat ccggagctta cggagtacct gtagagcttc 60

ctgtgcaagc 70

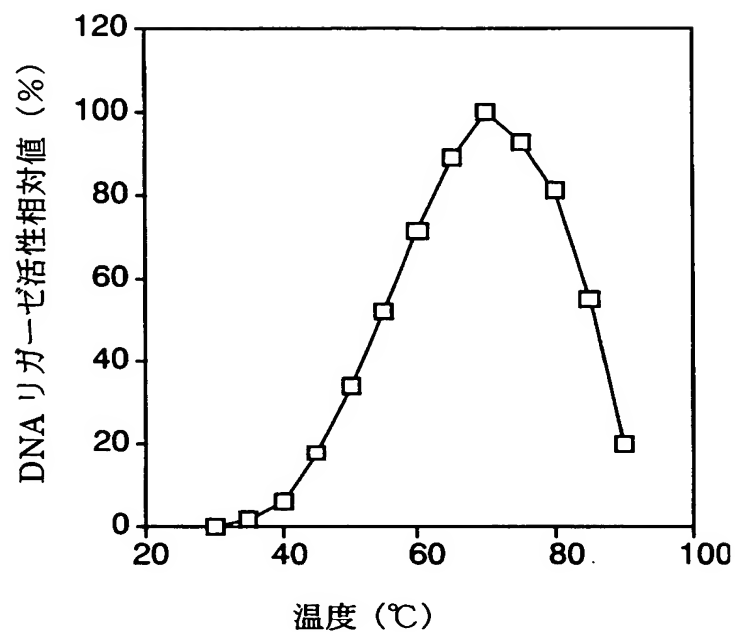
【図面の簡単な説明】

【図 1】 Aeropyrum pernix K-1株由来のDNAリガーゼの至適温度を示すグラフである。

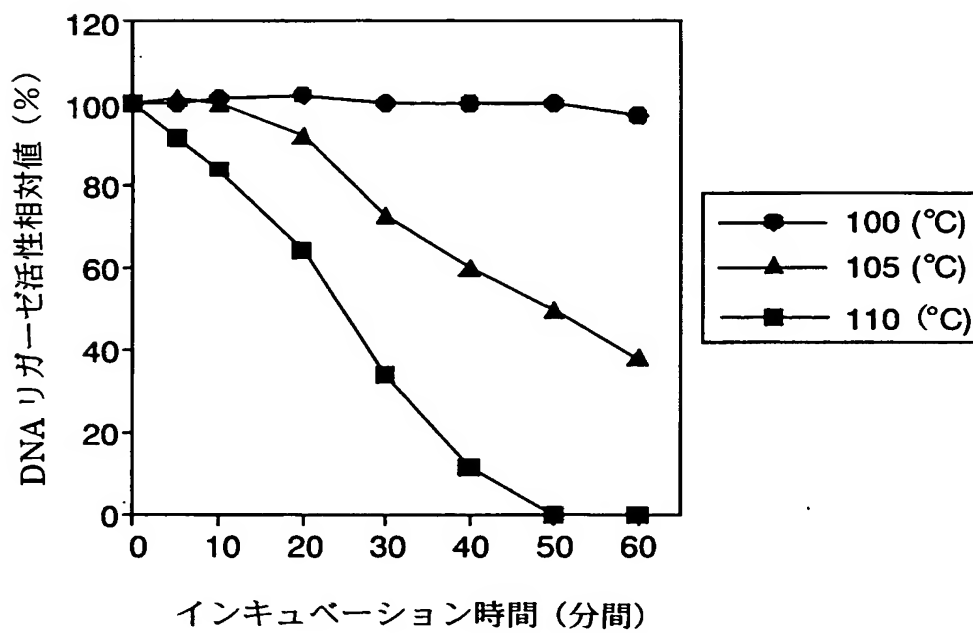
【図 2】 Aeropyrum pernix K-1株由来のDNAリガーゼを熱処理した場合の残存活性を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高温での熱処理の後にも高い活性を保持できるDNAリガーゼを提供する。

【解決手段】 本発明者は、*Aeropyrum pernix* K1株から100℃で1時間の熱処理によっても実質的に活性が低下しない耐熱性DNAリガーゼを単離し、そのアミノ酸配列とDNA配列を決定した。このDNAリガーゼは110℃で10分間の熱処理によっても85%以上の活性が残存する。この酵素は、コファクターとしてATP及びADPの双方を利用することができる。また、2価カチオンを要求するが、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 及び Co^{2+} のいずれも利用することができる。

【選択図】 図2

特願 2 0 0 3 - 0 4 5 2 2 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所